

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**STRUKTURA I FUNKCIJA HOLOENZIMA NA**  
**PRIMJERU BAKTERIJSKE RNA-POLIMERAZE**

**STRUCTURE AND FUNCTION OF HOLOENZYME**  
**EXEMPLIFIED BY BACTERIAL RNA-POLYMERASE**

**SEMINARSKI RAD**

Rea Bingula

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate study of Molecular Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Ivana Weygand-Čurašević

# Sadržaj

1. <u>Uvod</u> .....	1
2. <u>RNA-polimeraza</u> .....	2
2.1. <u>Bakterijska RNA-polimeraza</u> .....	2
2.1.1. <u>Struktura bakterijske RNA-polimeraze</u> .....	2
2.2. <u><math>\sigma</math>-podjedinica</u> .....	3
2.2.1. <u>Faktori <math>\sigma^{70}</math> i <math>\sigma^A</math></u> .....	4
2.2.2. <u>Faktor <math>\sigma^N</math> (<math>\sigma^{54}</math>)</u> .....	4
2.3. <u>Eukariotska RNA-polimeraza</u> .....	4
2.4. <u>Sličnost <math>\sigma</math> i transkripcijskih faktora</u> .....	4
3. <u>Inicijacija transkripcije</u> .....	6
3.1. <u>Prijelaz u elongacijsku fazu</u> .....	6
3.2. <u>Kruženje <math>\sigma</math>-faktora</u> .....	7
3.3. <u>Zadržavanje <math>\sigma</math>-faktora</u> .....	7
4. <u>Holoenzim</u> .....	9
4.1. <u>Prepoznavanje i interakcija s promotorom</u> .....	9
4.2. <u>Utjecaj RNA-polimeraze na molekulu DNA</u> .....	12
4.3. <u>Interakcije holoenzima i molekule DNA</u> .....	13
4.4. <u>Utjecaj drugih proteina</u> .....	15
5. <u>Zaključak</u> .....	15
6. <u>Literatura</u> .....	16
7. <u>Sažetak</u> .....	20
8. <u>Summary</u> .....	20





# 1. UVOD

Enzimi su biokatalizatori koje pronalazimo u svim živim organizmima. Otkriveni su polovicom 19.st. ali prva izolacija i kristalizacija bila je tek 1926.godine (Nelson i Cox, 2008). Većina enzima su proteini, iako su jedni od prvih enzima bile molekule RNA, a enzimska aktivnost mnogih je zadržana i u današnjem modernom svijetu.

Ako im je za aktivnost potreban neki dodatni element (ion, drugi protein), kofaktor, koji nije stalno vezan za enzim, nazivaju se apoenzimi ili apoproteini. Zajedno s kofaktorom apoenzim čini holoenzim. Većina kofaktora ne veže se kovalentno, već ostvaruje vrste molekulske interakcije. Holoenzimom se naziva i enzim koji aktivnost postiže tek kada sadrži sve svoje podjedinice, kao u slučaju DNA- i RNA-polimeraza.

Najprije nekoliko riječi o samom procesu u kojem sudjeluje holoenzim RNA-polimeraza. Transkripcija je kao prvi, ujedno i korak u kojem se odvija genska regulacija u ekspresiji gena. Cijeli proces je sličan replikaciji pomoću DNA-polimeraze, samo što u transkripciji nisu potrebne potpovršnice koje se „lijepe“ na 3'-kraj lanca kalupa, nego promotorske regije kodirajućeg lanca koje omogućavaju ispravno povezivanje enzima i molekule DNA.

Promotorske regije su sljedovi nukleotida uzvodno ili naprijed od početka gena koji kodiraju proteine (na potezu od 70 baza prije i 30 baza poslije samog početka gena) i mjesto su vezanja holoenzima RNA-polimeraze. U promotorima nalazimo konzensus sekvence – sekvence koje među vrstama imaju visoki stupanj sličnosti i očuvanosti, te su mjesto specifičnih interakcija s holoenzimom. (-10)-element (Pribnow sekvenca) je najočuvaniji i esencijalni bakterijski promotorski motiv (Hook-Barnard i Hinton, 2007; Shultzaberger i sur., 2007). Osim nje kod prokariota je još vrlo često prisutan i (-35)-element. Postoje i različiti dodatni promotori karakteristični za vrste, ali ova dva su prisutna u bakteriji *Escherichia coli*, koja će biti glavni modelni organizam u ovom seminaru.

RNA-polimeraza prepoznaje promotorsku sekvencu na kodirajućem lancu molekule DNA te joj lokalno odmotava kako bi dobila pristup lancu kalupa po kojem onda sintetizira komplementarnu molekulu RNA, mRNA. Neizostavne komponente transkripcije osim molekule DNA i holoenzima RNA-polimeraze su sve 4 vrste ribonukleozid-trifosfata (uridin-, adenzin-, gvanozin-, citidin-trifosfat) te ioni  $Mg^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ . Lanac RNA nadograđuje se na 3'-hidroksilnom kraju, antiparalelno lancu kalupa.

Cilj ovog seminarskog rada je bio proučiti interakcije podjedinica holoenzima unutar kompleksa i s molekulom DNA u prvim koracima transkripcije.

## 2. RNA-POLIMERAZA

RNA-polimeraza (tj. DNA-ovisna RNA-polimeraza) je mnogopodjedinjeni enzimatski kompleks odgovoran za proces transkripcije. Itaju i gensku uputu s kodiraju eg lanca DNA, lancu kalupu sintetizira komplementarnu molekulu mRNA potrebnu za daljnju sintezu proteina, translaciju. Razliiti tipovi RNA-polimeraza u sve tri domene života pokazuju evolucijsku konzerviranost (Ebright, 2000) sekvence, strukture i kataliti kog mehanizmu (Lane i Darst, 2010), razlike se naj eš e nalaze u postupku inicijacije samog procesa transkripcije.

### 2.1. Bakterijska RNA-polimeraza

Bakterijska RNA-polimeraza velik je i kompleksan enzim sastavljen od 5 podjedinica koje ine srž ( $r_{cSS}^{\sim}$ , Mr 388 981). Za razliku od eukariotske, bakterijska RNA-polimeraza sve 3 funkcije (inicijacija, elongacija, terminacija) obavlja samostalno (bez brojnih pomo nih proteina): pronalazak mjesta inicijacije, odmatanje dvolan ane molekule DNA, interakcija s reguliraju im proteinima, kataliziranje stvaranja fosfodieterske veze, pronalazak terminacijskog signala. Ipak, prema ve ini literaturnih navoda enzimu nedostaje dio za provjeru novosintetiziranog mRNA lanca, tj. 3'-5' egzonukleazna aktivnost ime je u ustalost pogreške pove ana na jednu grešku svakih  $10^4$ - $10^5$  ugra enih nukleotida. No, zbog velikog broja nastalih molekula mRNA i njihovom relativno kratkom životnom vijeku (pogotovo kod prokariota) ta razina pogreške je prihvatljiva. Mnoge RNA-polimeraze ipak mogu direktno hidrolizirati posljednji krivo ugra eni nukleotid još nepoznatim mehanizmom (Nelson i Cox, 2008).

#### 2.1.1. Struktura bakterijske RNA-polimeraze

Srž RNA-polimeraze je neophodna i služi slijede im funkcijama: otkrivanje mjesta prepoznavanja na  $\sigma$ -podjedinici i poja vanje vezanja pomo u dodatnih nespecifi nih interakcija s molekulom DNA (u fazi inicijacije) te polimeraznom aktivnoš u (u fazi elongacije) (Young i sur., 2001). Sama srž oblikom nalikuje rakovim kliještima, kojima su dvije najve e podjedinice ( $\beta$  i  $\beta'$ ) krakovi (Zhang i sur., 1999). Svaka od njih sastavljena je od 4 strukturna modula, koji su povezani ili neesencijalnim aminokiselinskim sekvencama ili me usobno razdvojeni (Kulbachinskiy i sur., 1999). Najmanje 6 razli itih modula sudjeluje u formaciji aktivnog mjesta, indiciraju i da su te dvije podjedinice blisko povezane u

globularnoj srži (Mustaev i sur., 1997). Promjer udubljenja aktivnog mjesta je  $25 \text{ \AA}^1$ , dovoljan da stane dvolan ana nukleinska kiselina. U njemu se još nalazi i ion magnezija ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Dvije identit ne  $\alpha$ -podjedinice nalaze se distalno od udubljenja, jedna interagira s podjedinicom  $\beta$  ( $\alpha'$ ), a druga s  $\beta'$  ( $\alpha''$ ). Svaka od  $\alpha$ -podjedinica sadrži dvije domene: N-terminalnu ( $\alpha\text{NTD}$ , koja interagira s  $\beta$ , tj.  $\beta'$ ) i C-terminalnu domenu ( $\alpha\text{CTD}$ , odgovornu za sekvencno-specifi ne interakcije protein-DNA s uzvodnim aktivatorima i represorima). Podjedinica  $\omega$  se tako er nalazi distalno, ali u kontaktu je samo s podjedinicom  $\beta'$  (Naryshkin i sur., 2000).

## 2.2. †-podjedinica

$\sigma$ -podjedinica je šesta, dodatna podjedinica ( $\sigma$ -faktor) koja se sa srži enzima spaja u holoenzim. Dvije su obitelji  $\sigma$  faktora - ve a obitelj obuhva a faktore s velikom strukturnom i funkcionalnom sli noš u s faktorom  $\sigma^{70}$ , odgovornim za transkripciju glavnih „housekeeping“ gena.  $\sigma^N$  je jedini poznati predstavnik druge skupine. Njegova sli nost aminokiselinskog slijeda sa  $\sigma^{70}$  je vrlo mala i postoje zna ajne razlike u mehanizmu djelovanja RNA-polimeraze kada je asocirana sa svakim od njih . Unato tome postoje mnoga zajedni ka mjesta na samom enzimu s kojim obje obitelji ostvaruju interakciju.

Kod bakterije *Escherichia coli* pronalazimo 7 razli itih vrsta  $\sigma$  -faktora (Tabela 1.). Njihovo reverzibilno vezanje za RNA-polimerazu omogu ava prepoznavanje razli itih promotora i prepisivanje razli itih skupina gena ovisno o trenutnim potrebama stanice. Selekcija promotora prema tome ovisi o kompeticiji me u faktorima, njihovoj zastupljenosti, afinitetu za srž enzima i prisutnosti anti- $\sigma$  faktora (Ishihama, 1997).

**Tabela 1.**  $\sigma$ -faktori bakterije *Escherichia coli*. \*postotak pronalaska u sklopu holoenzima.

$\sigma$ podjedinica	(nm)	Molekuli/stanica	Holoenzimski omjer (%) <sup>*</sup>	Funkcija
$\sigma^{70}$	0.26	700	78	Housekeeping geni
$\sigma^{32}$	0.30	110	8	Moduliranje stanične razine dušika
$\sigma^{33}$	4.20	<1	0	Geni stacionarne faze
$\sigma^{32}$	1.24	<10	0	Heat shock geni
$\sigma^{24}$	0.74	370	14	Geni za bičeve i kemotaksiju
$\sigma^{24}$	2.48	<10	0	Ekstracitoplazmičke funkcije neke "heat shock"
$\sigma^{54}$	1.73	<1	0	Ekstracitoplazmičke funkcije, uključujući transport i citrata

<sup>1</sup> ångström -  $10^{-10}$  m

### 2.2.1. Faktori $\sigma^{70}$ i $\sigma^A$

$\sigma^{70}$  je produkt gena rpoD (Ishihama, 2000; Murakami i Darst, 2003) sastavljen od 4 regije ( $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$ ,  $\sigma_3$ ,  $\sigma_4$ ). Spada u primarne, „housekeeping“ sigma faktore i prepisuje većinu gena koji su produkti potrebni u esencijalnim metaboličkim putevima.  $\sigma^A$  je ekvivalent  $\sigma^{70}$  u gram-pozitivnim bakterijama.

### 2.2.2. Faktor $\sigma^N$ ( $\sigma^{54}$ )

$\sigma^N$  glavna je varijanta  $\sigma^{70}$ . Sastavljen je od 3 regije, a kontrolira transkripciju gena koji se eksprimiraju uslijed specifičnih okolišnih uvjeta (Buck i sur., 2000; Reitzer i Schneider, 2001). Iako bez obitih sličnosti u sekvenci, oba  $\sigma$ -faktora vežu se za ista mjesta u enzimu. Ne postoji direktno saznanje o samoj disocijaciji s holoenzima, ali postoje dokazi da je taj korak relativno spor. Bez prisutnosti molekule DNA ili transkripcije, vjeruje se da je vrijeme poluživota holoenzima oko 200 s (Ferguson i sur., 2000).

## 2.3. Eukariotska RNA-polimeraza

Eukarioti posjeduju tri tipa RNA-polimeraze: I (sinteza preribosomalne RNA), II (sinteza glasnih kćerki, mRNA) i III (sinteza tRNA i 5S rRNA).

Iako puno kompleksnija od svog bakterijskog homologa, RNA-polimeraza II s njom dijeli vrlo visoki postotak konzerviranosti strukture, funkcije i samog mehanizma. Sastavljena je od 12 podjedinica od kojih neke vrlo nalikuju bakterijskima.

Kod eukariota opći transkripcijski faktori su neophodni za sam proces i također vrlo su važni. Svaki od 4 procesa, sastavljanje kompleksa-inicijacija transkripcije-elongacija-terminacija, odvija se ovim proteinima.

Eukariotskim analogom  $\sigma$ -podjedinice može se nazivati TBP (eng. *TATA-box binding protein*, vezuju i protein TATA-kutije), protein koji se veže za promotorsku sekvencu 5'TATA3'. U procesu transkripcije dolazi kao dio transkripcijskog faktora TFIID (Nelson i Cox, 2008).

## 2.4. Sličnost $\sigma$ i transkripcijskih faktora

Prepoznavanje specifične promotorske sekvence i njeno otaljeenje blisko su povezani. Kada je stvoren, transkripcijski mjehur s vrsto vezanom  $\sigma$ -podjedinicom izuzetno je stabilan,



izdržavaju i nekoliko krugova abortivne inicijacije prije nego li započne produktivna transkripcija. Ovu ulogu  $\sigma$ -podjedinice kod eukarijota obnašaju opći i transkripcijski faktori. Rezultat je isti: ispravni kompleksi s promotorom, stabilizirani interakcijama proteina i molekule DNA, preživljavaju, dok su nespecifični kompleksi, nedovoljno stabilizirani, kratkoživi i lako se disociraju. Promotorska specifičnost postiže se kinetičkom provjerom (eng. *proofreading*) (Liu i sur., 2011).

Kristalografijom je utvrđena nevjerojatna strukturna homologija između eukariotskog transkripcijskog faktora TFIIB i regije  $\sigma_3$ . Homologija je najprimjetnija između regije na C-kraju TFIIB-a i regije  $\sigma_3$ , te između B-prsta i B-spojnice i spojnice regije  $\sigma_3$  i  $\sigma_4$ . B-prst ulazi u aktivni centar polimeraze i dolazi u blizinu lanca kalupa, s kojim može stvarati stabilizirajuće veze. Spojnica regije  $\sigma_3$  i  $\sigma_4$  stoji na putu molekuli RNA koja izlazi iz aktivnog centra što dovodi do gubitka uzvodnih veza između promotorske DNA i  $\sigma$ -podjedinice (elementa (-35)) (Liu i sur., 2011). Istovremeno sinteza početne molekule RNA bez otpuštanja promotora dovodi do toga da polimeraza izvija nizvodni dio molekule DNA, stvarajući napetost za koju se vjeruje da potiče kidanje veza između regije  $\sigma_2$  i promotorskog elementa (-10), i omogućava prijelaz u fazu elongacije. Ista stvar događa se i s eukariotskim B-prstom.

### 3. Inicijacija transkripcije

Inicijacija transkripcije je bitni dio regulacije ekspresije gena. Uključuje vezanje holoenzima RNA-polimeraze (navođenog  $\sigma$ -podjedinicom) za dvolanu molekulu DNA, zatim taljenje promotora, abortivnu inicijaciju i napuštanje promotora. Započinje reverzibilnim vezanjem holoenzima za promotorsku sekvencu dvolane molekule DNA, što čini zatvoreni kompleks. Dolazi do taljenja promotora, stvaranja transkripcijskog mjehura (od pozicije -12 do +2), tzv. stvaranje otvorenog kompleksa. Po formiranju kompleksa uslijed konformacijskih promjena, holoenzim ulazi u abortivnu inicijaciju, koja je popraćena nepovratnim napuštanjem promotora, procesivnom elongacijom te terminacijom.

Bioinformatičko istraživanje pokazalo je da je regija duga 15 bp, smještena odmah uzvodno od eksperimentalno određene početke transkripcije kod bakterije *Escherichia coli*, sklonija taljenju od drugih regija genoma. 15 bp je upravo veličina transkripcijskog mjehura. To nije samo 6 od tih 15 baznih parova je sklonije taljenju pri termičkim fluktuacijama, i to oni u (-10)-sekvenci, koji za sobom zatim povlače i ostatak regije (kao i u Bundschuh, 2008).

Otvoreni kompleks nastaje najvjerojatnije u nekoliko (dva) koraka, kroz termičke fluktuacije promotorske regije, popraćene stabilizacijom formiranog transkripcijskog mjehura interakcijama RNA-polimeraze i kodirajućeg lanca DNA. Najprije se talji (-10)-sekvenca (što je i ograničavajući korak u reakciji), a zatim slijedi širenje transkripcijskog mjehura. Strukturni podaci govore da su konzervirani aromatski ostaci u  $\sigma$ -podjedinici idealno postavljeni za interakciju s bazama kodirajućeg lanca u regiji -10. Ove interakcije podupiru nastanak početnog kratkog segmenta rastaljene molekule DNA (~5 bp), koji će formirati uzvodni rub konačnog transkripcijskog mjehura (Murakami i Darst, 2003). Širenje transkripcijskog mjehura od pozicije -10 do +2 postavlja lanac kalup u aktivno mjesto RNA-polimeraze. Postoje značajni dokazi da bi konformacijske promjene u RNA-polimerazi odigrale važnu ulogu u drugom koraku prelaska u otvoreni kompleks (npr. potrebno je uklanjanje domene 1.1 RNA-polimeraze iz kanala u aktivnom mjestu kako bi mogao biti ubačen lanac kalup (Yuan i sur., 2006)).

#### 3.1. Prijelaz u elongacijsku fazu

Što se događa sa  $\sigma$ -podjedinicom nakon prelaska u fazu elongacije i danas je tema mnogih rasprava. Uvriježeno mišljenje je da nakon sinteze lanca RNA minimalne duljine od 9 do 11

nukleotida  $\sigma^{70}$  napušta kompleks, tj. da postoji „kruženje  $\sigma$ -faktora“. Ono je utemeljeno na kromatografskim i elektroforetskim analizama, ali ti eksperimenti uključuju grube postupke odvajanja koji mogu narušiti stabilnost  $\sigma^{70}$  unutar holoenzima. Zato je bilo potrebno razmotriti i alternativni model u kojem se stabilnost interakcija  $\sigma^{70}$  s ostatkom kompleksa smanjuje u prijelazu na elongaciju, zbog nepovoljnih interakcija između nastajuće RNA i  $\sigma^{70}$  (Daube i von Hippel, 1999), ali u kojem  $\sigma^{70}$  nije otpuštena.

### 3.2.1. Kruženje $\dagger$ -faktora

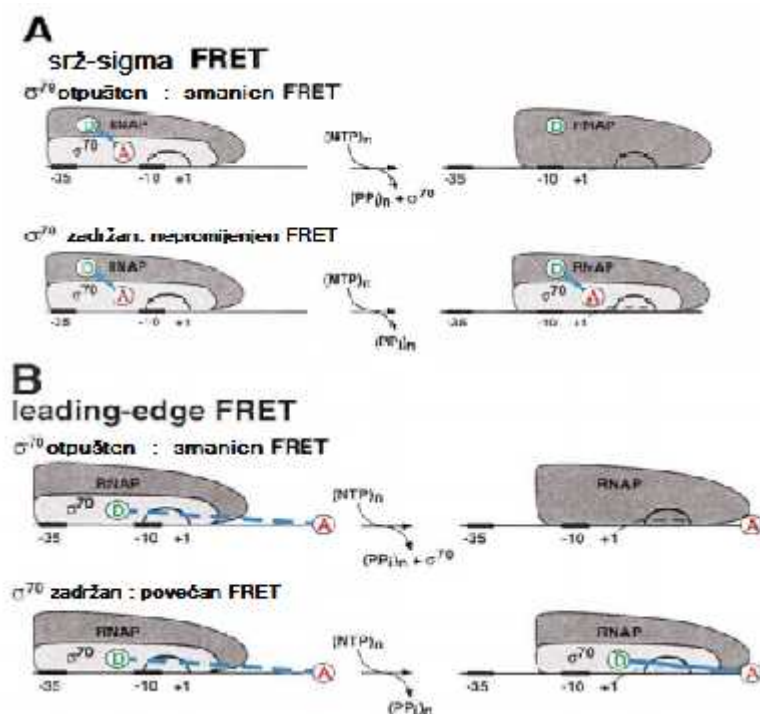
Vjerovalo se da zbog konformacijske promjene holoenzima nakon stvaranja otvorenog kompleksa dolazi do disocijacije  $\sigma$ -podjedinice, koja bi zbog svojeg visokog afiniteta za promotorom usporavala i ometala elongaciju. Uz to otkriven je protein NusA koji kompetira za vezno mjesto  $\sigma$ -podjedinice unutar holoenzima i smatralo se da time potiče njenu disocijaciju iz kompleksa. Po završetku transkripcije, NusA svoje mjesto ponovo prepušta jednoj od  $\sigma$ -podjedinica, omogućujući i novu inicijaciju (Nelson i Cox, 2008).

### 3.2.2. Zadržavanje $\dagger$ -faktora

Otkrivanje skupina RNA-polimeraza u *E.coli* koje zadržavaju  $\sigma^{70}$  i u elongaciji poljuljalo je prethodnu teoriju. Relativna brojnost takvih grupa ovisi o stani nom rastu i svoj maksimum postiže u stacionarnoj fazi. Takvi holoenzimi imaju značajnu prednost u izvođenju nekoliko neprekinutih krugova transkripcije zaredom na određenim promotorima, što govori o vjerojnoj ulozi u genskoj ekspresiji i regulaciji kod bakterija (Bar-Nahum i Nudler, 2001).

Afinitetnom kromatografijom utvrđeno je da takvi holoenzimi nisu specifični samo za jednu vrstu promotora nego njih nekoliko, te da protein NusA uzrokuje terminaciju transkripcije bez potrebe za disocijacijom samog  $\sigma^{70}$ -faktora.

Pomoću metode FRET (eng. *fluorescence resonance energy transfer*, fluorescencijski prijenos energije rezonancijom) (Slika 1.) dokazano je da u većini transkripcijskih kompleksa  $\sigma^{70}$  ne disocira s RNA-polimeraze po prijelazu s inicijacije na elongaciju. Metodom se prati kretanje molekule bliske molekuli DNA, ali ona ne uključuje korake razdvajanja. Korišten je „leading-edge FRET“, u kojem se prati pomicanje fluorescentno obilježene molekule u blizini fluorescentne probe u nizvodnom smjeru na molekuli DNA, i upravo je njime utvrđen ovaj fenomen.



**Slika 1.** Predviđanja rezultata pokusa upotrebom metode FRET. A – fluorescentni donor je ugrađen u RNA-polimerazu, a fluorescentni akceptor unutar podjedinice  $\sigma^7$ ; B – fluorescentni donor je ugrađen u podjedinicu  $\sigma^{70}$ , a fluorescentni akceptor nizvodno na molekuli DNA, (Mukhopadhyay i sur., 2001).

Rezultati su pokazali da je u 100% transkripcijskih kompleksa  $\sigma^{70}$  ostala asocirana i translocirana s RNA-polimerazom u prijelazu u elongaciju. U otvorenom kompleksu 9 nukleotida molekule RNA prisutno je kao hibrid RNA-DNA s lancem kalupom, a 2 nukleotida nalaze se u izlaznom kanalu molekule RNA koju tvori RNA-polimeraza, i može sadržavati 5 nukleotida (Korzheva i sur., 2000; Ebright, 2000). 70% transkripcijskih kompleksa zadržalo je  $\sigma^{70}$  po i nakon popunjavanja izlaznog kanala, a 60-70% i nakon sinteze RNA od 50 nukleotida u dužini. Ovo istraživanje opovrgava postojanje bitne mehanike razlike između inicijacije i elongacije (Mukhopadhyay i sur., 2001).

Orijentacija  $\sigma^{70}$  u odnosu na polimerazu u otvorenom i u elongacijskom kompleksu je gotovo identična: regija  $\sigma_1$  nalazi se u blizini nizvodne polovice transkripcijskog mjehura,  $\sigma_2$  blizu centra i uzvodne polovice mjehura, a  $\sigma_3$  i  $\sigma_4$  uzvodno od transkripcijskog mjehura (Naryshkin i sur., 2000; Ebright, 2000).  $\sigma^{70}$  veže jednaku sekvencu (sekvencu (-10) na kodirajućem lancu) i u otvorenom kompleksu, pokazuju i da je to dio normalnog procesa stvaranja otvorenog kompleksa (Young i sur., 2001).

## 4. Holoenzim

Slobodna  $\sigma$ -podjedinica (izvan kompleksa s enzimom) ne veže molekulu DNA. U holoenzimu molekula DNA prelazi preko jedne strane RNA-polimeraze, potpuno izvan aktivnog mjesta tako da se svi sekvencno-specifični kontakti s lancima ostvaruju preko  $\sigma$ -podjedinice (Murakami i sur., 2002).

Razmak između u promotorskih sekvenci, njihova orijentacija i udaljenost od početka transkripcije utječe na samu jačinu vezanja holoenzima i započinjanje transkripcije.

### 4.1. Prepoznavanje i interakcija s promotorom

Svaka od 4 konzervirane regije  $\sigma^{70}$ -podjedinice ( $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$ ,  $\sigma_3$ ,  $\sigma_4$ ) ostvaruje kontakt s određenim dijelom promotora ili enzima. Kod bakterije *Escherichia coli* unakrsnim fotopovezivanjem utvrđeno je 66 veza između u promotorske regije i RNA-polimeraze, te 19 između u promotorske DNA i  $\sigma^{70}$  ( $\sigma_1$  - niša,  $\sigma_2$  – (-10)-element,  $\sigma_3$  – produženi (-10)-element,  $\sigma_4$  – (-35)-element).  $\sigma_2$  „pokriva“ DNA u aktivnom centru, a  $\sigma_3$  i  $\sigma_4$  nalaze se izvan centra (Naryshkin i sur., 2000). Kao što je navedeno, faktor prepoznaje 2 konzensus sekvence – 5' TATAAT 3', 10, te 5' TTGACA 3', 35 baznih parova (bp) uzvodno od početka gena. Treća AT-bogata regija, takozvani UP-element (uzvodni promotor), nalazi se između u 40 i 60 bp uzvodno od početka gena kod promotora jako eksprimiranih gena, ali nju veže  $\alpha$ -podjedinica RNA-polimeraze (Nelson i Cox, 2008).

$\sigma^{54}$  kao promotore prepoznaje pozicije -24 (GG) i -12 (GC). Za razliku od  $\sigma^{70}$  koji u kompleksu s RNA-polimerazom spontano izomerizira u otvoreni kompleks,  $\sigma^{54}$  zahtjeva hidrolizu ATP-a pomoću u aktivatorskih proteina koji se vežu za pojačivačke regije (bEBP, eng. *bacterial enhancer binding proteins*, bakterijski proteini koji vežu pojačivačke) (Bose i sur., 2008). Ovaj proces nalikuje na onaj eukariotske RNA-polimeraze II, kada transkripcijski faktor TFIID trošenjem ATP-a razmata molekulu DNA (Kim i sur., 2000; Lin i sur., 2005).

$\sigma^A$  kod *Thermus aquaticus* prepoznaje i neke dodatne promotorske elemente (Tabela 2). Pomoću aptamera<sup>2</sup> utvrđeno je da je za vezanje  $\sigma^A$ -podjedinice bitan slijed 5' GGGA 3', koji se nizvodno nastavlja na 5' TATAAT 3' sekvencu. On omogućuje inicijaciju transkripcije bez prepoznavanja sekvence na poziciji -35. Također i prisutnost „produženog“ (-10)-promotora, tj. dodatak TG-motiva jedan bazni par uzvodno od standardne (-10)-sekvence

---

<sup>2</sup>oligonukleinska kiselina ili peptidna molekula koja se veže za specifičnu molekulsku metu

naj eš e uklju uje potpuno izostajanje (-35)-sekvence. Uklanjanje GGGA-motiva u prisutnosti (-35)-elementa inhibiralo je transkripciju pomo u Taq-polimeraze. On omogu uje prepoznavanje promotora i stvaranje kasnije faze otvorenog kompleksa, kada nedostaju (-35)-element i TG-motiv (Feklistov i sur., 2006). Kristalne strukture holoenzima iz *T. aquaticus* i *T. thermophilus* pokazuju da  $\sigma$ -podjedinica sadrži 3 domene povezane fleksibilnim poveznicama. Mjerenjem udaljenosti metodom luminescentnog prebacivanja energije rezonancijom (LRET, eng. *luminescence resonance energy transfer*) utvr ena je razlika u poziciji u holoenzimu i u slobodnom obliku (Callaci i sur., 1999).

**Tabela 2.** Podjedinice faktora  $\sigma^A$  bakterije *Thermus aquaticus* i promotorske sekvence s kojima ostvaruju interakciju

Promotorska regija (5' -> 3')	TTGACA (-35)	TG (produžena -10)	TATAAT (-10)	GGGA
Dio podjedinice	4.2	2.5	2.4	1.2

Kristalografijom su utvr eni univerzalno konzervirani aromatski ostaci unutar  $\sigma$ -podjedinice idealno postavljeni za kontakt s izloženim baznim parovima uzvodnog ruba transkripcijskog mjehura, a univerzalno konzervirani bazi ni ostaci regija 2.4 i 3.0  $\sigma$ -podjedinice osiguravaju kriti ni kontakt s fosfatnom okosnicom molekule DNA i igraju ulogu u usmjeravanju rastaljenog lanca kalupa u aktivno mjesto RNA-polimeraze, doprinose i elektrostatskom potencijalu. Struktura rezolucije 2.4 Å *Taq*  $\sigma^A_4$  kompleksa s (-35)-elementom potvrdila je ranija geneti ka istraživanja (Gross i sur., 1998) koja su pokazivala da aminokiselinski ostaci prepoznaju e zavojnice u motivu zavojnica-zavoj-zavojnica regije  $\sigma_4$  vežu element -35. U toj strukturi molekula DNA je savinuta oko prepoznaju e zavojnice za 36°. Dokazi metodom otisaka stopa (eng. *footprinting*) pokazali su da ove interakcije nastaju prve i da se održavaju kroz cijeli proces nastanka otvorenog kompleksa. Unutar konzerviranih regija 2.2 i 3.0  $\sigma_4$  su mjesta karakteristi ne interakcije s molekulom DNA. U regiji 3.0 His<sup>455</sup> i Glu<sup>458</sup> (*E. coli*) izloženi na površini  $\alpha$ -zavojnice okrenuti su prema velikom utoru produžene (-10)-sekvence molekule DNA, s kojom i reagiraju. U regiji 2.3 visokoo uvani aromatski aminokiselinski ostaci (Tyr<sup>425</sup>, Tyr<sup>430</sup>, Trp<sup>433</sup>) odgovorni su za taljenje promotora na uzvodnom rubu transkripcijskog mjehura. Univerzalno konzervirani bazi ni ostaci u regijama 2.2. i 2.3 (Arg<sup>414</sup>, Lys<sup>241</sup>) kriti ni su za vezanje molekule DNA, vjerojatno nespecifi no. Oba pozitivno nabijena ostatka interagiraju s negativno nabijenom

okosnicom kodiraju eg lanca na pozicijama -13/-14 (Arg<sup>414</sup>) i -15 (Lys<sup>241</sup>) (Murakami i sur., 2002).

$\sigma^{70}_2$  specifično se veže za jednolančanu kodirajuću (-10)-regiju. Svaki nukleotid (-10)-sekvence (5' T<sub>-12</sub>A<sub>-11</sub>T<sub>-10</sub>A<sub>-9</sub>A<sub>-8</sub>T<sub>-7</sub> 3') interagira s proteinom, po modelu ključ-brava. Interakcije koje pronalazimo između proteina i okosnice molekule DNA u svakom (-10)-elementu izuzetno su brojne. Bazno-specifične interakcije primarno se događaju s nukleotidima A<sub>-11</sub> i T<sub>-7</sub>. Struktura i biokemijski podatci podupiru model u kojem prepoznavanje (-10)-elementa, „izvlačenje“ baza iz dvolančane molekule DNA i njihovo vezanje  $\sigma$ -podjedinicom, dovodi do stvaranja otvorenog kompleksa. Aromatski i bazični aminokiselinski ostaci regije  $\sigma_2$  vjerojatno pomažu u okretanju nukleotida A<sub>-11</sub> potrebnog za ovaj proces i vežu jedan od lanaca DNA kako bi stabilizirali jednolančano stanje. Bitno je imati na umu da je taljenje pokretano termički i da  $\sigma$ -podjedinica može služiti samo u stabilizaciji stanja koje iz toga proizlazi, bez aktivnog trošenja energije (Liu i sur., 2011). Najbitnija uloga  $\sigma_2$  je osiguravanje povoljnih interakcija s razmotanim (-10)-elementom. Tijekom odmatanja promotora, RNA-polimeraza odmota otprilike 1.3 zavoja bez utroška energije, također vrlo eno afinitetom enzima za konačno stanje, tj. konformacijom promotora u otvorenom kompleksu (Feklistov i Darst, 2011).

5' T<sub>-14</sub>G<sub>-13</sub>T<sub>-12</sub> 3' tri su nukleotida koji se nalaze na rubu proteinske strukture, od kojih jedino T<sub>-12</sub> stvara značajnije interakcije s proteinom ( $\sigma$ -faktorom). Zajedno održavaju strukturu sličeći jednom lancu dvostruke zavojnice B-oblika, osim što se G nalazi u *syn*-konformaciji. Dvolančnost nizvodno od pozicije -12 sprječava W-dijadu (Trp<sup>256</sup>/Trp<sup>257</sup>) i ostali elementi proteina. T je favoriziran na poziciji -12, i on ostaje bazno sparen (dvolančan) i u otvorenom kompleksu. W256 stvara opsežne van der Waalsove interakcije primarno s deoksiribozom nukleotida T<sub>-12</sub>, W257 s pirimidinskim prstenom, a R246 (Arg<sup>246</sup>) polarne interakcije s 5'-fosfatnom skupinom. No ove interakcije ostvarene su bez obzira na tip baze. Preferiranost T objašnjava se pomoću Arg<sup>237</sup>, koji iz  $\alpha$ -zavojnice regije 2.2  $\sigma$ -podjedinice stvara vodikovu vezu s O4 atomom nukleotida T<sub>-12</sub>, a alifatski dio lanca Lys<sup>241</sup> van der Waalsovu vezu s C5-metilom. Regija 2.4 sadrži alelnu-specifične supresore mutacija u (-10)-elementu - Gln<sup>437</sup> još je jedna od potpuno oduvanih aminokiselina u glavnoj skupini  $\sigma$ -faktora, te njegova supstitucija dovodi do nespecifičnog prepoznavanja nukleotida T<sub>-12</sub>. Na poziciji -12 u lancu kalupu sparuje se s A, a u kodirajućem s T. Thr<sup>440</sup> uz malu promjenu strukture također dolazi u doticaj s T (Murakami i sur., 2002).

Najo uvanija pozicija (-10)-elementa je A<sub>-11</sub>. Njegova mutacija obično uzrokuje potpunu inaktivaciju promotora i nestabilnost otvorenog kompleksa (Lee i sur., 2004; Lim i sur., 2001). W256 iz dijade ostvaruje interakcije s okosnicom nukleotida A<sub>-11</sub> i zauzima mjesto gdje bi se nalazila riboza drugog lanca. Ovo uvjetuje okretanje cijelog nukleotida, ija baza izlazi iz niza baza koji formiraju nukleotidi T<sub>-14</sub>G<sub>-13</sub>T<sub>-12</sub>, i potpuno se ukopava u hidrofobni proteinski džep. Sam džep prepun je interakcija koje se ostvaruju isključivo s adeninom i nije ga moguće supstituirati niti jednom drugom bazom (Feklistov i Darst, 2011).

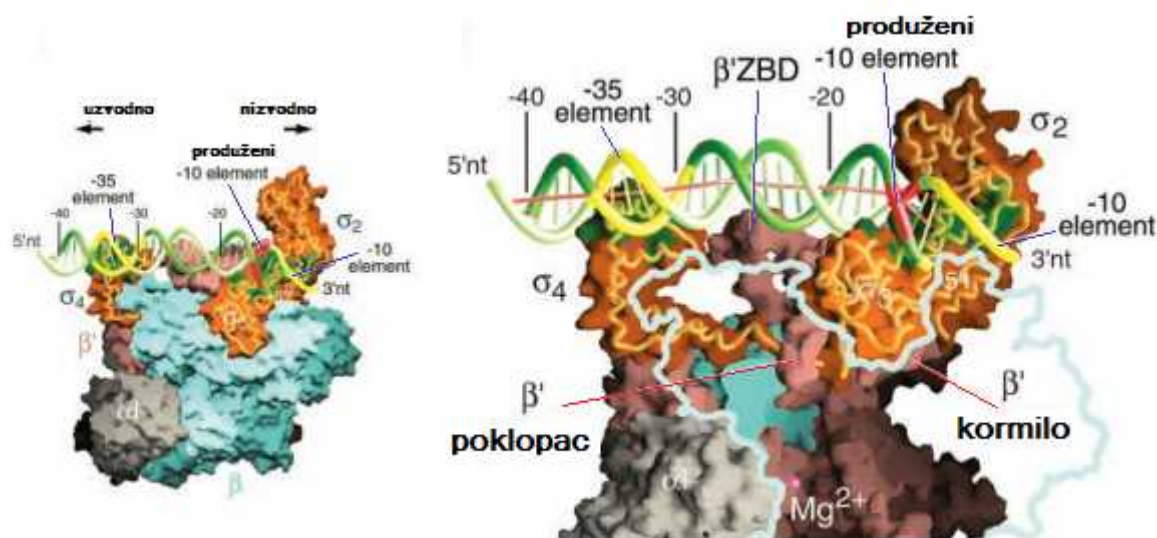
Niz baza T<sub>-10</sub>A<sub>-9</sub>A<sub>-8</sub> ostaje poslagan, u suprotnom smjeru od površine proteina, a interakcija se ostvaruje putem šećerno-fosfatne okosnice. Nastavak niza prekinut je okretanjem nukleotida T<sub>-7</sub>. On ulazi u još jedan proteinski džep koji formiraju konzervirane regije 1.2, 2.1 i 2.3  $\sigma$ -podjedinice. Ovaj džep je hidrofilan i prostran, te sadrži strogo uređene molekule vode koje sudjeluju u prepoznavanju baze. Ovime je pokazano da je struktura nastalog kompleksa ovisna o gotovo potpunoj o uvanosti baza na pozicijama -11 i -7, a nešto manje na preostale tri (Liu i sur., 2011). Izme u  $\sigma$ -podjedinice (Arg<sup>208</sup>) i molekule DNA (fosfat nukleotida na poziciji -6) nastaje i vrlo bitan ionski most.

## 4.2. Utjecaj RNA-polimeraze na molekulu DNA

Od pozicije -11 lanci molekule DNA se razdvajaju i kreću u zasebnim putevima. (Slika 2.) Kodiraju i lanac s (-10)-sekvencom prolazi regiju  $\sigma_2$ , gdje može interagirati s izloženim aromatskim ostacima  $\sigma$ -regije 2.3. Na potezu od pozicije -2 do +4 lanac prolazi kroz utor izme u 2 režnja podjedinice  $\beta$  ( $\beta_1$  i  $\beta_2$ ). Tunel u koji mora ući i lanac kalup sastavljen je od  $\sigma_2$ ,  $\sigma_3$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta'$ -poklopca i  $\beta'$ -kormila. Nizvodni dvolan i dio molekule DNA od pozicije +5 do +12 zatvoren je hvataljkom u drugom tunelu izme u podjedinica  $\beta$  i  $\beta'$ . Taj dvolan i dio izuzetno je bitan za stabilnost cjelokupnog kompleksa (Nudler i sur., 1996). Eksperimentalno je utvrđeno da prilikom translokacije enzima molekula DNA mora rotirati unutar kompleksa (Harada i sur., 2001).

RNA-polimeraza u ovim kompleksima stvara mnoge neprimjetne zavoje u uzvodnom području kako bi osigurala što veće područje za ostvarivanje veza. Na aminokraju  $\beta'$  podjedinice nalazi se Zn<sup>2+</sup>-vezna domena ( $\beta'$ ZBD) koja vjerojatno ostvaruje kontakt s okosnicom molekule DNA izme u produženog (-10) i (-35) elementa, na poziciji (-22) u lancu kalupu i (-27) u kodirajućem lancu. Na poziciji (-25) molekula DNA se savija za 8° prema velikom utoru koji se nalazi upravo ispred  $\beta'$ ZBD. Na poziciji (-16) molekula DNA oštro zavija prema RNA-polimerazi pod kutem od 37° (Murakami i sur., 2002).





**Slika 2.** Prikaz *Taq* holoenzima u kontaktu s promotorskim regijama. Regije polimeraze prikazane su slijede im bojama:  $\alpha$ I,  $\alpha$ II,  $\omega$  - siva;  $\beta$  - cijano;  $\beta'$  - roza;  $\sigma$  - naran asta. Molekularna površina  $\sigma$ -podjedinice je djelomi no prozirna, otkrivaju i unutrašnju  $\alpha$ -uglji nu okosnicu (svjetlo naran asto). Proteinske površine u kontaktu s molekulom DNA su zelene boje, te su isklju ivo na  $\sigma$ -podjedinici. Lanci molekule DNA su prikazani kao fosfatne okosnice (kalup tamno zeleno, kodiraju i svjetlo zeleno). Elementi -35 i -10 su žuti, a produženi element -10 je crven. (Murakami i sur., 2002)

Neki promotori sadrže UP-elemente, uzvodne, AT bogate, na pozicijama od -40 do -60). Te elemente prepoznaje i veže  $\alpha$ -podjedinica C-terminalne domene ( $\alpha$ CTD).  $\alpha$ CTD je 80-aminokiselinska globularna domena spojena 14-aminokiselinskom spojnicom na  $\alpha$ -aminoterminalnu domenu ( $\alpha$ NTD), te služi i kao meta mnogih aktivatora transkripcije.

#### 4.3. Interakcije holoenzima i molekule DNA

Selektivno vezanje za promotorsku (-10)-regiju kodiraju eg lanca klju no je za proces inicijacije. Vezanjem RNA-polimeraze faktor  $\sigma^{70}$  mijenja svoju funkciju. Dok je samostalan slabo veže kodiraju i i nešto ja e lanac kalup, no vezanjem RNA-polimeraze prepoznavanje lanca kalupa opada, a raste prepoznavanje kodiraju eg, što holoenzimu daje selektivnost. To potvr uje i injenica da neki aminokiselinski ostaci u regiji 2.3 postaju manje izloženi otapalu nakon vezanja za srž enzima, potvr uju i alosteri ku promjenu.

Nedavno objavljenja kristalna struktura RNA-polimeraze iz *Thermus aquaticus* pokazuje da aminokiseline od 1-550 u  $\beta'$  podjedinici imaju dvije hidrofilne regije razdvojene ukopanim hidrofobnim potezom aminokiselina (Zhang i sur., 1999). Jedna od tih hidrofilnih regija poti e selektivno vezanje  $\sigma$ -faktora i kodiraju eg lanca. U pokusu niža temperatura poti e formiranje peptidne zavojnice koja je omogu ila  $\beta'$ (260-550)-konstruktu indukciju

vezanja kodiraju eg lanca, sugeriraju i važnost takve uzvijene zavojnice za funkciju RNA-polimeraze, iako je samo 1/70 cjelokupnog enzima (Young i sur., 2001).

U *E. coli*,  $\sigma^{70}$  sadrži mjesta za prepoznavanje promotora u polovici bližoj C-kraju (Gardella i sur., 1989; Siegele i sur., 1989). U slobodnom obliku, ta mjesta su sakrivena kroz interakciju C- i N-kraja, ali postaju izloženi kada se  $\sigma$  veže za srž enzima. Time nastaje funkcionalno sposobna tercijarna struktura s mogućnošću u prepoznavanja jednolanane promotorske sekvence molekule DNA. Pomoću UV-induciranog unakrsnog povezivanja molekule DNA i proteina dokazano je da upravo uvijena zavojnica  $\beta'$ -podjedinice od 48 aminokiselina potiče faktor  $\sigma^{70}$  na obavljanje svoje funkcije gotovo jednako učinkovito kao i sama srž RNA-polimeraze. Interakcija s regijom 2.2 (najopu uvanija u obitelji proteina  $\sigma^{70}$ ) uzrokuje alosteričku promjenu u regiji 2.4 koja omogućava  $\sigma^{70}$ -podjedinici da prepozna promotorsku regiju (-10) na kodirajućem lancu. Na koji način djeluje ova alosterička regulacija još nije poznato. Kristalografijom je utvrđeno da se  $\alpha$ -uzvojnica iz regije 2.2 nalazi odmah iza  $\alpha$ -uzvojnice koju stvaraju regije 2.3 i 2.4, te je moguće da jedna uzrokuje promjene u drugoj. Takva interakcija bi mogla stabilizirati konformaciju regije 2.2 i fiksirati aminokiselinske ostatke u zavojnici 2.3-2.4 u konformaciji komplementarnoj kodirajućem lancu, ili pak suprotno, ometati međusobno vezanje zavojnica, izlažući dodatne hidrofobne ostatke potrebne za vezanje kodirajućeg lanca. Prepoznavanje kodirajućeg lanca je dakle postignuto sa samo 47 kDa, tj. 1/10 holoenzima. (aminokiseline od 262-309). Metodom FRET utvrđeno je efikasnost ovog peptida u indukciji vezanja  $\sigma^{70}$  za kodirajući lanac od 65% u odnosu na cjelokupni enzim (Young i sur., 2001).

Iako interakcija uvijene zavojnice podjedinice  $\beta'$  i regije 2.2 ima jasan utjecaj na aktivnost  $\sigma^{70}$ , još nije poznato postoji li i neki utjecaj na samu aktivnost RNA-polimeraze. No uvijena zavojnica podupire kormilo, prstusličnu strukturu, za koju se vjeruje da sudjeluje u razdvajanju RNA/DNA hibrida (Korzheva i sur., 2000; Zhang i sur., 1999). Nije isključeno da interakcija uvijene zavojnice i  $\sigma^{70}$  može promijeniti položaj kormila, udaljiti ga od početne pozicije i time ukloniti steričke smetnje između kormila i promotorske DNA tijekom inicijacije.

U doticaju s molekulom DNA domena hvataljke RNA-polimeraze, zajedno s vezanom regijom  $\sigma_2$ , rotira prema kanalu za  $3^\circ$ , dodatno ga zatvarajući.  $\beta$ -poklopac, zajedno s vezanom regijom  $\sigma_4$ , rotira za  $4^\circ$ , rezultirajući i nizvodnim pomicanjem zavojnice regije  $\sigma_4$  koja zatim prepoznaje promotorski element (-35) (Murakami i sur., 2002).

Mjesta na srži enzima koja nespecifično vežu molekulu DNA nalaze se i na  $\beta$  i na  $\beta'$  podjedinici. Nakon asocijacije sa  $\sigma^{70}$ , te interakcije nestaju. To je u skladu s prvim pretpostavkama da po završetku inicijacije  $\sigma$ -faktor disocira, a da srž enzima onda ostvaruje interakcije s RNA-produktom ili DNA-kalupom (Krakow i von der Helm, 1970).

#### 4.4. Utjecaj drugih proteina

Rsd je protein od 158 aminokiselina koji interagira s faktorom  $\sigma^{70}$  (Jishage i Ishihama, 1998) stvaraju i kompleks u omjeru 1:1 (Westblade i sur., 2004) i sprječava ga u asocijaciji sa srži RNA-polimeraze.

Pomoću u nanoprotokne elektrospršivačke masene spektrometrije (eng. *nanoflow electrospray mass spectrometry*), zajedno s tandemnom masenom spektrometrijom, proučavana je interakcija  $\sigma^{70}$  i srži RNA-polimeraze. Protein Rsd je regulator  $\sigma^{70}$  i veže ga u njegovoj slobodnoj formi, ali također interagira i sa srži enzima. Dodavanjem veće količine zamjenjuje  $\sigma^{70}$  i stvara komplekse Rsd:srž polimeraze te Rsd: $\sigma^{70}$ , kojem prethodi nestabilan ternarni kompleks Rsd:  $\sigma^{70}$ :srž polimeraze (Ilag i sur., 2004). Naglaša se da Rsd u kompleksu s RNA-polimerazom ima ulogu u navođenju na određene skupine promotora.

### 5. Zaključak

$\sigma$ -podjedinica neophodna je za obavljanje funkcije holoenzima. Evolucijom je postala specifična za određene promotore te različitim mehanizmima i interakcijama s drugim molekulama omogućava preciznu regulaciju genske ekspresije.

Interakcije dijelova inicijacijskog kompleksa međusobno su ovisne i isprepletene, te je potpuno ovisnost specifičnih sljedova ključna za pravilno odvijanje inicijacije.  $\sigma$ -faktor zadržava se i u kasnijim fazama transkripcije, te možda igra i neku do sada nepoznatu ulogu.

## 6. Literatura

1. Bar-Nahum, G., Nudler, E. (2001). Isolation and characterization of  $\sigma^{70}$ -retaining transcription elongation complexes from *Escherichia coli*. *Cell* 106, 443-451
2. Bose, D., Pape, T., Burrowa, P.C., Rappas, M., Wigneshweraraj, S.R., Buck, M., Zhang, X. (2008). Organization of an activator-bound RNA polymerase holoenzyme. *Molecular Cell* 32, 337-346
3. Buck, M., Gallegos, M.T., Studholme, D.J., Guo, Y., Gralla, J.D. (2000). The bacterial enhancer-dependent  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ) transcription factor. *J. Bacteriol.* 182, 4129-4136.
4. Callaci, S., Heyduk, T. (1998). Conformation and DNA binding properties of a single-stranded DNA binding region of sigma 70 sub-unit from *Escherichia coli* RNA polymerase are modulated by an interaction with the core enzyme. *Biochemistry* 37, 3312-3320.
5. Daube, S., von Hippel, P. (1999). Interactions of *Escherichia coli*  $\sigma^{70}$  within the transcription elongation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8390-8395.
6. Orlov, M., Bundschuh, R. (2008). Formation of the open complex by bacterial RNA polymerase – a quantitative model. *Biophysical Journal* 94, 4233-4248
7. Ebright, R. (2000). RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.* 304, 687-689.
8. Feklistov, A., Barinova, N., Sevastyanova, A., Heyduk, E., Bass, I., Vvedenskaya, I., Kuznedelov, K., Merkiene, E., Stavrovskaya, E., Klimašauskas, S., Nikiforov, V., Heyduk, T., Severinov, K., Kulbachinskiy, A. (2006). A basal promoter element recognized by free RNA polymerase  $\sigma$  subunit determines promoter recognition by RNA polymerase holoenzyme. *Molecular Cell* 23, 97-107
9. Feklistov, A., Darst, S.A. (2011) Structural basis for promoter -10 element recognition by the bacterial RNA polymerase  $\sigma$  subunit. *Cell* 147, 1257-1269
10. Ferguson, A.L., Hughes, A.D., Tufail, U., Baumann, C. G., Scott, D. J., Hogget, J. G. (2000). Interaction of  $\sigma^{70}$  with *Escherichia coli* RNA polymerase core enzyme studied by surface plasmon resonance. *FEBS Letters* 481, 281-284
11. Gardella, T., Moyle, H., Susskind, M.M. (1989) A mutant *Escherichia coli*  $\sigma^{70}$  subunit of RNA polymerase with altered promoter specificity *J. Mol. Biol.* 206, 579-590.

12. Gross, C. A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Rupy, J., Young, B. (1998). The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 63, 141-155
13. Harada, Y., Ohara, O., Takatsuki, A., Itoh, H., Shimamoto, N., Kinoshita, K. (2011) Direct observation of DNA rotation during transcription by *Escherichia coli* RNA-polymerase. Nature 409, 113-115
14. Hook-Barnard, I.G., Hinton, D.M. (2007). Transcription initiation by mix and match elements: flexibility for polymerase binding to bacterial promoters. Gene Regul. Syst. Bio 1, 275–293.
15. Ilag, L.L., Westblade, L.F., Deshayes, C., Kolb, A., Busby, S.J.W., Robinson, C.V. (2004). Mass spectrometry of *Escherichia coli* RNA polymerase: Interactions of the core enzyme with  $\sigma^{70}$  and Rsd protein. Structure 12, 269-275
16. Ishihama, A. (1997) Promoter selectivity control of RNA polymerase. Nucleic Acids Mol. Biol. 11, 51-70.
17. Ishihama, A. (2000). Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. Annu. Rev. microbiol. 54, 499–518
18. Jishage, M., Ishihama, A. (1998). A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major sigma subunit of RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 4953–4958.
19. Kim, T.K., Ebright, R.H., Reinberg, D. (2000). Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIH. Science 288, 1418–1422.
20. Korzheva, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A., Darst, S.A. (2000). A structural model of transcription elongation. Science 289, 619–625.
21. Krakow, J.S., von der Helm, K. (1970) Azotobacter RNA Polymerase Transitions and the Release of Sigma. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 73-83.
22. Kulbachinskiy, A., Mustaev, A., Goldfarb, A., Nikiforov, V. (1999) Interaction with free  $\beta'$  subunit unmasks DNA-binding domain of RNA polymerase  $\sigma$  subunit. FEBS Letters 454, 71-74
23. Lane, W.J., Darst, S.A. (2010). Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: sequence analysis. J. Mol. Biol. 395, 671–685.
24. Lee, H.J., Lim, H.M., Adhya, S. (2004). An unsubstituted C2 hydrogen of adenine is critical and sufficient at the -11 position of a promoter to signal base pair deformation. J. Biol. Chem. 279, 16899–16902.

25. Lim, H.M., Lee, H.J., Roy, S., Adhya, S. (2001). A “master” in base unpairing during isomerization of a promoter upon RNA polymerase binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14849–14852.
26. Lin, Y.C., Choi, W.S., Gralla, J.D. (2005). TFIIH XPB mutants suggest a unified bacterial-like mechanism for promoter opening but not escape. *Nat.Struct. Mol. Biol.* 12, 603–607.
27. Liu, X., Bushnell, D.A., Kornberg, R.D. (2011). Lock and key to transcription:  $\sigma$ -DNA interaction. *Cell* 147, 1218-1219
28. Mukhopadhyay, Y., Kapanidis, A.N., Mekler, V., Kotrkhonjia, E., Ebright, Y.W., Ebright, R. H. (2001). Translocation of  $\sigma^{70}$  with RNA polymerase during transcription: fluorescence resonance energy transfer assay for movement relative to DNA. *Cell* 106, 453-463
29. Murakami, K.S., Darst., S.A. (2003). Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 31–39.
30. Murakami, K.S., Masuda, S., Campbell, E.A., Muzzin, O., Darst, S.A. (2002). Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science* 296, 1285-1290
31. Mustaev, A., Kozlov, M., Markovtsov, V., Zaychikov, E., Denissova, L., Goldfarb, A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6641-6645.
32. Naryshkin, N., Revyakin, A., Kim, Y., Mekler, V., Ebright, R.H. (2000) Structural organization of the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell* 101, 601-611
33. Nelson, D.L., Cox, M.M. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*; Fifth edition, W.H. Freeman and Company, New York, 1021-1033
34. Nudler, E., Avetisova, E., Markovtsov, V., Goldfarb, A. (1996) Transcription Processivity: Protein-DNA Interactions Holding Together the Elongation Complex. *Science* 273, 211-217
35. Reitzer, L., Schneider, B.L. (2001). Metabolic context and possible physiological themes of  $\sigma^{54}$ -dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol.Biol. Rev.* 65, 422–444.
36. Shultzaberger, R.K., Chen, Z., Lewis, K.A., Schneider, T.D. (2007). Anatomy of *Escherichia coli*  $\sigma^{70}$  promoters. *Nucleic Acids Res.* 35, 771–788.

37. Siegele, D.A., Hu, J.C., Walter, W.A., Gross, C.A. (1989) Altered promoter recognition by mutant forms of the  $\sigma^{70}$  subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. J. Mol. Biol. 206, 591-603.
38. Westblade, L.F., Ilag, L.L., Powell, A.K., Scott, D.J., Kolb, A., Robinson, C.V., Busby, S.J.W. (2004). Studies of *Escherichia coli* Rsd protein and its interaction with the RNA polymerase  $\sigma^{70}$  subunit. J. Mol. Biol. 335, 685–692.
39. Young, B.A., Anthony, L.C., Gruber, T.M., Arthur, T.M., Heyduk, E., Chi Zen Lu, Sharp, M.M., Heyduk, T., Burgess, R.R., Gross, C.A. (2001). A coiled-coil from the RNA polymerase  $\beta'$  subunit allosterically induces selective nontemplate strand binding by  $\sigma^{70}$ . Cell 105, 935-944
40. Yuan, C., E. Rhoades, X.W. Lou, Archer, L.A. (2006). Spontaneous sharp bending of DNA: role of melting bubbles. Nucleic Acids Res. 34, 45-54.
41. Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., Darst, S.A. (1999). Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. Cell 98, 811–824.

## 7. Sažetak

RNA-polimeraza zajedno sa  $\sigma$ -podjedinicom čini holoenzim sposoban za specifično prepoznavanje promotorske sekvence te započinjanje važnog procesa u genskoj ekspresiji, transkripcije. Međusobno vezanje promotorskih sljedova, polimeraze i  $\sigma$ -podjedinice dovodi do niza alosteričkih promjena – otkrivanje vezanih sljedova, stvaranje novih ionskih mostova, formiranje aktivnih mjesta, de/stabilizacija određenih struktura, itd. koje osiguravaju specifičnost holoenzima za određeni promotor.

Također brojne međumolekulske interakcije s bazama promotora održavaju visoku konzerviranost određenih nukleotida ( $A_{-11}$ ,  $T_{-7}$ ) u svim domenama.

Jedno od najvažnijih otkrića sigurno je bilo da se  $\sigma$ -podjedinica zadržava nakon same inicijacije jer je time složenost regulacije postala još veća, s obzirom da isti kompleks sada odjednom mora prelaziti između nekoliko stanja u kojima afinitet za nekoliko konstantnih sljedova u određenom trenu mora rasti ili padati, kako bi se postigao prijelaz s jednog procesa na drugi. Današnje tehnike obilježavanja fluorescentnim probama, kristalografije i masene spektrometrije otvaraju put preciznijim saznanjima o građi i interakcijama ovakvih kompleksnih struktura kao što su holoenzimi te će u budućnosti vjerojatno mnoge dosadašnje dogme također biti poljuljane.

## 8. Summary

RNA-polymerase together with the  $\sigma$ -subunit creates a holoenzyme capable of specific promoter sequence recognition. Thus it can commence important step of gene expression – transcription. Interwoven binding of promoter sequence, polymerase and  $\sigma$ -subunit leads to a number of allosteric modifications – exposure of binding sequences, salt bridge establishments, active site formation, specific structure de/stabilization, etc., all of which guarantee promoter-specificity of holoenzyme.

Also, numerous intermolecular interactions with promoter bases maintain high conserved nucleotide sequence ( $A_{-11}$ ,  $T_{-7}$ ) in all living domains.

One of the biggest discoveries certainly is the retaining of  $\sigma$ -subunit after the initiation. The complexity of regulation has increased even more since the same complex has to recognize the same sequences but with different affinity at different point in time, so the transition from one state to another can be achieved. Nowadays, techniques such as



fluorescence probing, crystallography or mass spectrometry, lead to more precise organization or interaction determination inside the complex structures such as holoenzymes that will probably lead to many reconsiderations of what was thought to be dogmatic.